

VIRGINIA MANTOVANI BENEVENUTO

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE METAIS PESADOS SOBRE A
CROMATINA DE HEPATÓCITOS DE *Hoplias malabaricus*
(BLOCK, 1794): UMA ABORDAGEM MORFOMÉTRICA

Monografia apresentada à disciplina Estágio II
em Biologia Celular como requisito parcial à
conclusão do Curso de Ciências Biológicas, Setor
de Ciências Biológicas, Universidade Federal do
Paraná.

Orientador: Prof. Marco A. F. Randi

CURITIBA

2003

Agradecimentos

Agradeço especialmente a todas as pessoas que participaram diretamente na minha formação acadêmica e pessoal.

A meus pais, Heleno e Vera, por estarem presente em todos os momentos e por sempre me apoiarem nas minhas decisões.

Aos meus irmãos, Helver e Vanêssa, pelas discussões e brincadeiras.

Ao Marco, pela orientação, pelo meu crescimento acadêmico, pela sua compreensão e seu bom humor.

À Cláudia Nogata, por ser uma pessoa em que posso confiar e dividir os momentos alegres e tristes, pelas noites de estudo e pelos programas culturais.

À Angela Pellin, pelas festas, viagens, congressos, caminhos perdidos, mas que no fim acaba sendo o certo, não é Angela?

Ao Daniel, por agüentar meus momentos de mau humor e por incentivar minhas idéias por mais absurdas que sejam.

Aos amigos Bruno e Felipe, por dizerem verdades que eu precisava ouvir e pelo ombro amigo no momento em que eu mais precisei.

Ao André Maizena, pelas discussões “filosóficas”.

Aos meus amigos do curso de Ciências Biológicas, pelos momentos de descontração nas festas do CAEB e viagens.

Aos colegas de laboratório (Carol, Chico, Chuli, Fabíola, Fafá, Inês, João, Maritana, Rogério, Si e Sushi) pela ótima convivência e pelos divertidos dias de trabalho.

Ao professor Ciro, por me incentivar a permanecer na área de Toxicologia Celular.

Ao professor Guilherme Karan pelos bons conselhos.

Ao Setor de Ciências Biológicas, ao Departamento de Zoologia da UFPR e ao laboratório de Estudos de Impacto Ambiental, pelo uso dos equipamentos para captura de imagens.

Sumário

Resumo.....	iv
Introdução.....	1
Objetivos	10
Material e Métodos.....	11
<i>Espécie estudada e aclimatação</i>	11
<i>Contaminação</i>	11
<i>Coleta e processamento do material</i>	12
<i>Obtenção das imagens digitais e análise do material</i>	13
Resultados	16
<i>Esfericidade Nuclear</i>	16
<i>Área nuclear</i>	20
<i>Densidade Óptica Integrada (IOD)</i>	24
<i>Dispersão (área x IOD)</i>	28
<i>Métodos de Captura de Imagens</i>	29
Discussão.....	30
<i>Análise dos parâmetros esfericidade, área nuclear e IOD</i>	30
<i>Dispersão (área x IOD)</i>	33
<i>Métodos de captura de imagens</i>	33
Conclusões	36
Referências Bibliográficas	37

Resumo

A análise morfométrica oferece parâmetros (como: área, esfericidade, absorbância) que podem ser usados para estudar alterações nucleares provocadas por xenobiontes. Diversas substâncias tóxicas são produzidas e lançadas no ambiente pelo homem. As atividades industrial e agrícola vêm aumentando o número de compostos químicos introduzidos na natureza que prejudicam a saúde de diversos organismos, dentre esses compostos estão o TBT (tributil-estanho) e HgCH_3^+ (metilmercúrio) e o Pb^{++} (chumbo inorgânico), que por sua vez é um metal pesado. Esses 2 compostos organometálicos e o Pb^{++} podem causar alterações na organização estrutural da cromatina das células do fígado de *Hoplias malabaricus* (traíra). Verificar essas alterações foi um dos objetivos deste trabalho. Outro objetivo foi comparar os 3 diferentes métodos de captura de imagens que foram usados para este estudo. Foram realizados 3 experimentos (um para cada contaminante), em que indivíduos de *Hoplias malabaricus* foram contaminados a cada 5 dias por via trófica. Para a coleta do fígado cada animal foi anestesiado antes de ser sacrificado. “Imprints” sobre lâminas histológicas de hepatócitos foram fixados em uma solução de etanol e ácido acético e foram corados pela reação de Feülgen. A morfometria foi realizada a partir de fotomicrografias digitalizadas e da digitalização direta de imagens a partir das lâminas. Os parâmetros analisados foram: esfericidade, área nuclear e densidade óptica integrada (IOD). Com os resultados obtidos é possível concluir que os 3 xenobiontes provocam alterações na morfologia nuclear e que o melhor método para captura de imagens é o qual as imagens são diretamente digitalizadas.

Palavras-chave: morfometria; núcleo; traíra; estanho; chumbo; mercúrio.

Introdução

A análise morfométrica de imagens permite conhecer uma imagem pela quantificação de seus elementos (que podem variar de células e núcleos a parafusos e porta-aviões). A quantificação desses elementos inclui as medidas de tamanho, indicadores de forma e descrições sobre os contornos (BAXES, 1994). Assim, a análise de imagens pode fornecer parâmetros relacionados ao núcleo como área, perímetro, forma, volume, valores de transmitância, absorbância, etc. Essa análise tem sido utilizada para o estudo dos núcleos de algumas células como hepatócitos de peixes e ratos e de células epiteliais de mama humana.

Os estudos morfométricos também possibilitam quantificar o DNA através da densidade óptica integrada (IOD), uma vez que esse parâmetro está relacionado com a intensidade de coloração do objeto. Segundo SMITH *et al.* (1996), é possível relacionar a IOD com a quantidade de DNA presente no núcleo quando este é corado com Schiff azul (azure A). Esse autor usou a análise de imagens como ferramenta para estudar a poliploidia de DNA, demonstrando a existência de agrupamentos distintos de núcleos de hepatócitos de ratos: 2C (diploide), 4C (tetraploide) e 8C (octaploide).

Alterações na estrutura morfológica do núcleo é um dos parâmetros para o diagnóstico do câncer. Células epiteliais de mama normais têm um núcleo esférico ou oval com membrana lisa, enquanto amostras de tumor têm núcleos maiores e apresentam variações em suas formas (PIENTA & COFFEY, 1991). O mesmo estudo mostra que a área nuclear aumenta de uma média de $25 \mu\text{m}^2$ em pacientes normais para $59 \mu\text{m}^2$ em pacientes com metástase no momento da mastectomia. Os pesquisadores chegaram a conclusão que quanto maior a área nuclear maior a malignidade do quadro.

Segundo VIDAL *et al.* (1998), os resultados da análise de imagens de sua pesquisa realizada, com células epiteliais de mama humana transformadas por benzo[a]pireno, indicam que mudanças na quantidade de DNA e no estado de “empacotamento” de ordem maior da cromatina acompanham a expressão de diferentes estágios do processo tumorgênico “in vitro”. Através da IOD pôde-se

inferir que ocorreu perda gradual de DNA. A diminuição na quantidade de DNA corado com Feülgen em células no início do processo é maior que em células nos estágios mais avançados. Dessa maneira, a análise de imagem possibilitou o aperfeiçoamento da distinção entre os fenótipos nucleares de células normais, transformadas e tumorgênicas. Somente a análise de imagens não é suficiente para afirmar qual o estado de expressão nuclear, porém é vantajoso para a discriminação do estágio que a célula se encontra (VIDAL *et al.*, 1998).

A reação de Feülgen é específica para DNA e estequiométrica nas concentrações nucleares desta molécula, o que permite realizar o estudo morfométrico nuclear e conseqüentemente analisar as alterações que podem ocorrer no material genético provocadas por algum tipo de contaminante ou agente estressor (VIDAL & MELLO, 1987; VIDAL *et al.*, 1998).

A análise morfométrica fornece parâmetros de avaliação quantitativa discreta, permitindo uma análise rápida e barata dos processos de estresse celular, além de ser precisa na identificação tecidual. Esses parâmetros podem ser úteis por serem bons biomarcadores morfológicos.

Através de marcadores biológicos é possível indicar a magnitude da resposta de organismos a contaminantes, pois os biomarcadores são avaliados em diferentes níveis de organização biológica. Os biomarcadores podem ser estudados em animais provenientes de ambientes contaminados para quantificar e entender o significado da exposição destes organismos a diferentes substâncias químicas. Respostas biológicas e ecológicas a um contaminante podem variar desde mudanças no nível molecular, onde a integridade genética e processos nucleares são envolvidos, até o nível de população e comunidade, onde as dinâmicas e estruturas de toda cadeia alimentar podem ser afetadas (ADAMS, 1990; SHUGART *et al.*, 1992). Segundo HINTON (1990), se um organismo está sendo afetado por algum composto, apresenta manifestações teciduais que representam um efeito intermediário entre os níveis bioquímico e de reprodução. A histopatologia tem sido altamente reconhecida como uma ferramenta de valor para avaliação de campo e de impacto de poluentes ambientais na vida marinha, pois é um método rápido para detectar efeitos crônicos adversos de contaminantes em vários tecidos de organismos

marinhos (JOHNSON *et al.*, 1993). As alterações histológicas ocorrem mais cedo em mais curto prazo que as alterações reprodutivas de uma espécie. Os parâmetros histológicos são mais sensíveis que os parâmetros de crescimento e de reprodução e, como um parâmetro integrativo, fornecem um melhor acompanhamento nas mudanças da saúde do organismo quando comparados a um simples parâmetro bioquímico (SEGNER & BRAUNBECK, 1988). Os indicadores histopatológicos de contaminantes mais usados em peixes marinhos são as lesões hepáticas neoplásicas e preneoplásicas. O estudo de JOHNSON *et al.* (1993) demonstra haver uma relação entre as concentrações de contaminantes químicos em sedimentos e as lesões hepáticas e em outros tecidos, nos conteúdos estomacais que foram examinados de peixes (*Pleuronectes americanus*) coletados em 22 pontos da Costa Noroeste dos Estados Unidos da América.

Estudos de avaliação de contaminação e de monitoramento do meio ambiente por substâncias tóxicas no Brasil são realizados periodicamente pela CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental). Segundo EYSINK *et al.* (1988), o relatório final de 1986 da CETESB “Avaliação dos Níveis de Contaminação por Metais Pesados e Pesticidas Organoclorados da Água, Ictiofauna e outros Organismos Aquáticos do Complexo Estuarino-Lagunar Iguape-Cananéia” teve como uma das principais conclusões a presença de metais pesados na bacia do Rio Ribeira e, de uma forma mais significativa, detectou-se a presença de chumbo. O chumbo inorgânico é um metal pesado introduzido no ambiente principalmente pela ação antropogênica. Na última década, teores excessivos de chumbo foram aferidos no sedimento e em peixes do Complexo Lagunar-Estuarino de Iguape-Cananéia-Paranaguá (EYSINK *et al.*, 1988, 1990; CETESB, 1991). Isso se deve principalmente à atividade de mineração que foi exercida no Alto Vale do Ribeira. Outros metais, que ultrapassaram os limites estabelecidos tanto para água como para sedimento, evidenciados pelo estudo de EYSINK *et al.* (1988) foram o zinco e o cobre. Esses metais pesados quando são lançados no Complexo Lagunar-Estuarino de Iguape-Cananéia-Paranaguá prejudica as espécies marinhas que lá se reproduzem, pois o complexo é considerado o segundo maior berçário de espécies marinhas do Brasil. Além disso, os xenobiontes podem ser levados para regiões

muito distantes do local onde foram lançados, uma vez que o Rio Ribeira deságua no Oceano Atlântico, no Litoral Sul do Estado de São Paulo.

Segundo KLAASSEN (1987), alguns casos isolados de intoxicação por chumbo têm sido atribuídos a diferentes fontes como: brinquedos fabricados com esse metal, poeiras de chumbo nas galerias de tiro ao alvo, compostos solúveis saturninos existentes em encanamentos de chumbo, pigmentos usados nas tintas para artistas, cinzas e fumaças de madeira pintada, resíduos das oficinas de joalheiros e fabricação caseira de bateria. Nos Estados Unidos, a produção clandestina de uísque muitas vezes utiliza radiadores de automóveis como condensadores, o que faz do chumbo um contaminante freqüente (KLAASSEN, 1987).

São vários os efeitos que estão relacionados à contaminação pelo chumbo nos organismos, como as disfunções cerebrais, renais e alterações na atividade enzimática. Estudo realizado por COOPER & STEINBERG (1977) sobre a transmissão neuromuscular simpática da safena de coelhos, constatou a inibição do efeito adrenérgico causada pelo chumbo. Desde 1973, estudos demonstram evidências fisiológicas de que tanto as transmissões sinápticas colinérgicas quanto as adrenérgicas podem ser afetadas pelo chumbo (MANALIS & COOPER, 1973; KOBER & COOPER, 1976; COOPER & STEINBERG, 1977). Segundo MANALIS & COOPER (1973) o chumbo, também afeta a transmissão neuromuscular somática por interferir na liberação de neurotransmissores na fenda sináptica.

Um outro contaminante que geralmente está presente em ambientes aquáticos com intensa atividade portuária é o composto organometálico tributil-estanho (TBT). Desde 1970 costuma-se empregar o TBT em tintas que são utilizadas em casco de embarcações, para impedir a fixação de organismos (PELLETIER, 1995). Outros exemplos da utilização industrial do TBT é sua aplicação em PVC, como estabilizador do polímero, e na proteção da madeira contra fungos e bactérias. Já na agricultura é utilizado como pesticida (FENT & HUNN, 1995). No Brasil, o tráfego intenso de embarcações em zonas costeiras e em rios, bem como a possível descarga de efluentes industriais contendo TBT, têm resultado no despejo do composto na água e no sedimento (OLIVEIRA RIBEIRO, 2002).

Peixes submetidos a tratamentos com TBT podem apresentar alterações celulares em alguns órgãos, o que leva a crer que o composto é o responsável por essas alterações. Dessa forma, pode haver um comprometimento da fisiologia do animal devido a alterações na organização tecidual. O tipo de tecido e órgão afetados pode variar de acordo com o tipo de contaminação (via trófica, hídrica etc.), o que não quer dizer que a forma de contaminação limita o contaminante a órgãos ou a tecidos específicos.

Pela contaminação da água com o TBT, o peixe pode ser atingido nas brânquias e na retina e vir a ter o funcionamento dessas estruturas comprometido. Já os peixes expostos ao TBT por via trófica podem ser prejudicados pelo comprometimento de órgãos como fígado e rins. Em fígado de rato a toxicidade do TBT foi identificada em um estudo realizado por KRAJNC *et al.* (1984), que demonstrou inflamação do ducto biliar e necroses.

Experimentos “in vivo” e “in vitro” mostram que o TBT pode inibir o sistema enzimático citocromo P450 em animais, um importante sistema de desintoxicação celular. Assim, o TBT pode se associar e inativar as enzimas desse complexo protéico (FENT & STEGMAN, 1993). O sistema P450 é responsável pelas reações de biotransformação de xenobiontes lipossolúveis em compostos hidrossolúveis. Devido a esse fato, o sistema P450 é importante para o metabolismo do TBT, sendo que neste sistema enzimático ocorre o primeiro passo para a desintoxicação e excreção do contaminante, que pode gerar produtos intermediários mais tóxicos que a própria molécula de origem (FENT & BUCHELI, 1994). Esses produtos intermediários, que podem surgir em vários animais como mamíferos, peixes e invertebrados, são o dibutilestanho (DBT) e monobutilestanho (MBT).

Estudos realizados por CIMA & BALLARIN (1999) com hematócitos de *Botryllus schlosseri*, uma espécie de Tunicata, demonstraram que o TBT provoca alterações no núcleo e no citoplasma dessas células. As alterações nucleares mais evidentes nesse caso são a condensação da cromatina e a fragmentação do DNA, levando a célula à apoptose. Ainda como indícios de apoptose foi demonstrada a translocação de fosfatidilserina para a face externa da membrana plasmática. Em material exposto ao TBT, a taxa de apoptose foi significativamente maior que nos

indivíduos controle. Nesses estudos pode-se também observar uma alteração na morfologia celular (CIMA & BALLARIN, 1999).

Um outro xenobionte que foi estudado no presente trabalho é o mercúrio, que por mais de 2000 anos tem sido utilizado na agricultura como fungicida. Nos Estados Unidos esse metal tem um alto consumo no uso de mecanismos elétricos (baterias, interruptores, iluminações), na produção química (produção de soda cáustica e tintas) e de artefatos odontológicos (BAHNICK & SAUER, 1994). De acordo com CLARKSON (1992), o mercúrio já foi usado na confecção de detonadores de bombas de guerra, para restauração dentária e nos garimpos do território brasileiro tem sido utilizado indiscriminadamente. A deposição de mercúrio no município de Alta Floresta (MT, Brasil) apresentou um aumento na época de dificuldades econômicas no Brasil devido aos efeitos negativos do plano econômico implantado pelo ex-presidente Fernando Collor de Mello. Pela mineração de ouro se tratar de um baixo investimento com alto retorno de capital essa tendência foi também observada em outras partes do mundo em desenvolvimento (CORDEIRO *et al.*, 2002). Assim, a disseminação do mercúrio em suas diferentes formas químicas aumentou em grande escala principalmente em ambientes aquáticos (CLARKSON, 1992).

Este metal pode estar presente no ambiente em três formas químicas: vapores de mercúrio (mercúrio elementar, Hg^0), sais de mercúrio (mercúrio inorgânico) e compostos mercuriais orgânicos (KLAASSEN, 1987). Quando esse metal é lançado no ambiente sob a forma inorgânica, é transformado em um elemento altamente perigoso pela ação de bactérias, o metilmercúrio (HgCH_3^+) que, livre na água, atravessa facilmente as membranas celulares. Portanto, a metilação do mercúrio inorgânico no sedimento de lagos e rios é um meio significativo para a entrada desse metal na cadeia trófica de ambientes aquáticos (EYSINK *et al.*, 1988).

O mercúrio apresenta um alto potencial de bioacumulação e de toxicidade (BAHNICK & SAUER, 1994). Segundo MALM (1993), espécies de peixes piscívoras, devido a biomagnificação, são potencialmente mais eficientes em concentrar mercúrio que outras espécies de níveis tróficos inferiores. Em um estudo realizado na reserva de Munduruku (PA, Brasil) onde vive uma comunidade indígena, os

maiores teores de mercúrio foram encontrados em peixes: barbado, surubim, traíra e tucunaré, sendo que os dois últimos são consumidos com mais frequência pela comunidade local. Os peixes herbívoros apresentaram concentrações de mercúrio relativamente menores (BRABO *et al.*, 2000).

As populações mais afetadas pela absorção e incorporação do mercúrio são as que possuem o hábito de consumirem frequentemente pescados provenientes de ambientes contaminados ou as que estão envolvidas com a atividade de extração de ouro. Na Bacia do rio Amazona, aproximadamente 1 milhão de pessoas estão envolvidas na atividade garimpeira, que se estende por mais de 25 anos (MALM, 1993). KLAASSEN (1987) relata que os sinais clínicos provocados pela exposição do organismo humano ao metilmercúrio devem-se principalmente a manifestações neurológicas.

Como já citado anteriormente, em muitos casos há uma forte relação entre os teores de contaminantes encontrados no sedimento e no conteúdo estomacal, no fígado ou na bile, confirmando que contaminantes orgânicos no sedimento estão biodisponíveis para os peixes e seus organismos predadores (JOHNSON *et al.*, 1993). Estudos anteriores sugerem que lesões hepáticas em *Pleuronectes americanus* (uma espécie de peixe marinho) podem ser um biomarcador seguro para indicar a degradação ambiental na Costa Leste dos Estados Unidos da América (JOHNSON, 1993).

Hepatócitos de peixes nórdicos (*Salvelinus alpinus*) contaminados pelo HgCH_3^+ por via trófica, apresentaram um aumento na quantidade de heterocromatina (OLIVEIRA RIBEIRO *et al.*, 2002). Outro estudo, porém com peixes tropicais (*Astyanax bimaculatus*), demonstra que o TBT também promove aumento na condensação da cromatina nuclear dos hepatócitos (OLIVEIRA RIBEIRO *et al.*, 2002).

Uma das funções do fígado é a troca de metabólitos entre o sangue e os hepatócitos, que são células derivadas do epitélio primitivo. “Os hepatócitos são responsáveis pela síntese, degradação e armazenamento de grande número de substâncias; têm a função central no metabolismo de carboidratos e lipídios do corpo como um todo; secretam a maioria das proteínas encontradas no plasma

sanguíneo” (ALBERTS *et al.*, 1997). Como todas essas funções são controladas pelo núcleo, acredita-se que alterações nessa estrutura afetam o metabolismo da célula hepática. Essas alterações podem ser provocadas por ligações de metais pesados ao DNA, mudando a conformação da molécula comprometendo sua função de síntese, ou por alterações provocadas em proteínas regulatórias ou estruturais.

A avaliação das alterações provocadas por metais pesados na cromatina torna-se uma contribuição significativa para o entendimento dos processos celulares desencadeados por agentes estressante. A análise morfométrica combinada com outros parâmetros – moleculares, genéticos, histológicos – permite acompanhar e propor modelos sobre os mecanismos de ação de agentes contaminantes.

Além desses fatores, o estudo com *Hoplias malabaricus* (traíra), por se tratar de um peixe que ocorre em região tropical e subtropical, é importante para o esclarecimento sobre a influência de metais pesados (estanho, chumbo e mercúrio) em peixes dessa região. Os dados sobre contaminação por esses metais são quase que exclusivamente relatados para peixes de regiões temperadas e polares. Um estudo realizado por Oliveira Ribeiro (2000) apresentou os primeiros resultados comparativos de bioacumulação de mercúrio inorgânico entre peixes nórdicos (*Salvelinus alpinus*) e tropicais (*Thrichomycterus zonatus*). Esses resultados demonstraram que nas mesmas concentrações por um mesmo período, as brânquias de peixes tropicais sofrem alterações mais severas que as de peixes nórdicos, o que sugere que peixes tropicais são mais sensíveis ao mercúrio que os peixes nórdicos.

A traíra, *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794), pertence à ordem Characiformes e à família Erythrinidae. Pode ser encontrada em todo o território brasileiro, pois trata-se de uma espécie com ampla distribuição geográfica neotropical, abrangendo quase todas as bacias desde a América Central até o rio Colorado (Argentina) e apresentando diferentes áreas de endemismo. Geralmente, habita o ambiente lântico e de águas rasas e apresenta um comportamento territorialista. É uma espécie onívora no primeiro ano de seu desenvolvimento, podendo alimentar-se de microcrustáceos, algas e insetos aquáticos. Normalmente após alcançar 12 cm de comprimento passa a ser estritamente carnívora, altamente especializada à piscivoria e possui a habilidade de abocanhar suas presas inteiras.

Preferencialmente, as traíras se alimentam de *Astyanax* sp, porém quando esse alimento é escasso, incluem em sua dieta outros animais como os crustáceos. Esses outros animais podem ser habitantes da coluna d'água ou mesmo animais bentônicos (LOPEZ E FENOCCHIO, 1994; LOUREIRO, 1995; LOWE-MCCONNELL, 1999).

Assim, por se tratar de um animal de topo de cadeia com uma ampla distribuição geográfica (neotropical) a traíra pode ser considerada como um bom modelo biológico para estudos em relação à toxicologia ambiental.

Objetivos

- determinar se a morfometria do núcleo é um bom biomarcador.
- estudar os efeitos dos contaminantes TBT (tributil-estanho), Pb^{++} (chumbo inorgânico) e $HgCH_3^+$ (metilmercúrio), quando administrados por via trófica, na organização estrutural da cromatina e do núcleo de hepatócitos de *Hoplias malabaricus*, através da análise de parâmetros morfométricos.
- comparar os métodos de captura de imagens para análises morfométricas de núcleos de hepatócitos.

Material e Métodos

Espécie estudada e aclimação

Exemplares de *Hoplias malabaricus* foram coletados em tanques de piscicultura em 3 localidades do estado do Paraná: numa chácara em São José dos Pinhais, na Fazenda Experimental do Canguiri (Universidade Federal do Paraná) e em uma estação de piscicultura de Toledo. Os indivíduos foram aclimatados por um período de 15 dias em aquários de 30 litros (1 indivíduo por aquário), com aeração constante, filtro interno, temperatura e fotoperíodo (12h claro/ 12h escuro) controlados.

A manutenção dos aquários foi realizada através da sifonagem de 1/3 da água, que era substituída por água filtrada, da troca dos filtros e da limpeza das paredes internas do aquário com uma esponja.

Foram realizados 3 experimentos, cada qual com um dos 3 contaminantes (TBT, Pb^{++} e $HgCH_3^+$). No experimento com TBT, de 12 animais, 6 foram utilizados como controle. O experimento com Pb^{++} foi realizado com 3 indivíduos controles e 6 contaminados. E com o $HgCH_3^+$, 9 traíras foram utilizadas como controle e 9 foram tratadas com o contaminante (Tab. 1).

Contaminação

Após o período de aclimação, as traíras foram tratadas, por via trófica, a cada 5 dias, pela captura e ingestão de exemplares de *Ciprinus sp.* (carpa) nos experimentos com TBT e Pb^{++} , e de *Astyanix sp.* (lambari) no experimento realizado com $HgCH_3^+$. As traíras foram contaminadas pela injeção intra-peritoneal de cada contaminante no respectivo vetor oferecido vivo, correspondente ao experimento. As doses utilizadas de cada xenobionte foram as seguintes: 0,3 μg TBT $\cdot g^{-1}$ diluído em óleo de milho (Sigma Co), 21 μg $Pb^{++}\cdot g^{-1}$ e 0,072 μg $HgCH_3^+\cdot g^{-1}$, diluídos em água destilada (Tab.1). Os exemplares do grupo controle foram alimentados com o vetor contendo apenas os veículos utilizados na contaminação, correspondente a cada grupo tratado (óleo de milho e água

destilada). Os experimentos com TBT e Pb^{++} duraram 42 dias, totalizando em 8 as contaminações. O experimento com HgCH_3^+ durou 62 dias, com o total de 12 contaminações (tabela 1).

Tabela 1 – experimentos realizados com respectivas doses ministradas em *Hoplias malabaricus* a cada 120 h. C: indivíduos controles e T: indivíduos tratados.

<i>experimento</i>	<i>Doses (μg do contaminante $\cdot \text{g}^{-1}$ de traíra)</i>	<i>n.º de doses</i>	<i>1ª coleta</i>	<i>2ª coleta</i>
TBT	$0,3 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$	4 e 8	3C + 3T	3C + 3T
Pb^{++}	$21 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$	4 e 8	3T	3C + 3T
HgCH_3^+	$0,075 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$	12	9C + 9T	—

Coleta e processamento do material

Nos experimentos com TBT e Pb^{++} , foram realizadas 2 coletas, sendo a primeira após completadas 4 doses e a segunda após o total de 8 doses. No experimento com o TBT, em cada coleta foram sacrificados 3 animais controles e 3 animais tratados. No experimento em que o Pb^{++} foi o contaminante, na primeira coleta foram sacrificados 3 animais do grupo tratado e na segunda 3 animais controles e 3 animais tratados. No experimento com HgCH_3^+ , também foi realizada apenas 1 coleta, em que foram sacrificados 9 indivíduos controles e 9 animais do grupo dos tratados. Todas as coletas ocorreram 2 dias após a última alimentação de cada traíra.

Os procedimentos a seguir foram iguais para os 3 experimentos.

Para as coletas, cada peixe foi retirado do aquário e anestesiado com MS222 (0,02%). Foi feito um corte longitudinal na parte ventral do animal para a exposição dos órgãos internos. Uma amostra do fígado foi usado para o preparo das lâminas histológicas através da técnica de “imprint”, onde os núcleos inteiros dos hepatócitos ficam aderidos à lâmina. A seguir, o material foi fixado em uma solução de etanol e ácido acético na proporção 3:1 (v/v) durante 1 minuto, sendo então lavado em etanol 70% por 2 minutos. Posteriormente as lâminas foram coradas através da reação de Feülgen (MELLO & VIDAL, 1980) com as seguintes condições

de hidrólise: HCl 4,0 M; 25°C; 45 min.. Uma curva de hidrólise foi anteriormente realizada, para determinar o tempo ótimo de hidrólise desse material. As lâminas foram diafanizadas em xilol e montadas em Polymount.

Obtenção das imagens digitais e análise do material

As lâminas prontas do experimento com o TBT foram analisadas e fotografadas sob fotomicroscópio Zeiss Axiophot (objetiva 63x/1.4, planapocromática). Para fotografar as lâminas do experimento com o Pb^{++} foi utilizado um fotomicroscópio Olympus equipado com objetiva 100x/1.25, planacromática. Os negativos foram revelados em papel fotográfico e as imagens foram digitalizadas em "scanner" de mesa com resolução óptica de 300 dpi para que posteriormente fosse realizado o processo de análise morfométrica (tabela 2).

O material obtido do experimento com $HgCH_3^+$ foi analisado e suas imagens foram diretamente digitalizadas através dos equipamentos para análise de imagens do Departamento de Zoologia da Universidade Federal do Paraná. Para a captura de imagens foi utilizado um microscópio Olympus (objetiva 40x/0.75, planapocromática) com uma câmera CCD acoplada e o "software" de captura e análise de imagem Image Pro Express. A resolução de captura da câmera é de 100 dpi (tabela 2).

Tabela 2 – Especificações dos equipamentos utilizados para a captura das imagens

<i>experimento</i>	<i>equipamento</i>	<i>objetiva</i>	<i>digitalização das imagens</i>	<i>Resolução (dpi)</i>
TBT	Fotomicroscópio Zeiss Axiophot	63x / 1.4 planapocromática	"scanner"	300
Pb^{++}	Fotomicroscópio Olympus	100x / 1.25 planacromática	"scanner"	300
$HgCH_3^+$	Microscópio Olympus	40x / 0,75 planapocromática	câmera CCD + "software" Image Pro Express	100

Os parâmetros morfométricos analisados foram: esfericidade nuclear, área nuclear e densidade óptica integrada (IOD). Os valores desses parâmetros foram obtidos através do “software” gratuito de análise de imagem UTHSCSA Image Tool para Windows versão 2.02 (desenvolvido na University of Texas Health Science Center at San Antonio, Texas e disponível na Internet por "anonymous" FTP em <ftp://maxrad6.uthscsa.edu>).

A esfericidade nuclear é calculada através da seguinte fórmula:

$$\text{Esfericidade} = \sqrt{(4 \times \text{área} / \pi)} \cdot (\text{comprimento do eixo maior})^{-1}$$

Este parâmetro promove um resultado que indica quanto o objeto está próximo à forma circular. O resultado será um valor entre 0 e 1. Quanto maior o valor, mais esférico é o objeto. Se o valor for igual a 1, o objeto é um círculo perfeito; conforme o valor vai diminuindo, o objeto vai se distanciando da forma circular (WILCOX *et al*, 1999).

Para o cálculo da área foi feita uma calibração no software de análise, permitindo-se obter os valores em micrômetros quadrados (μm^2).

A IOD é calculada através do valor de absorbância de cada núcleo multiplicado pela sua área. O valor de absorbância é calculado a partir do logaritmo inverso da transmitância média, que por sua vez é obtida dividindo-se o valor de intensidade de coloração do núcleo pelo do fundo da imagem (transmitância=100%).

Esses dados posteriormente foram submetidos a tratamentos estatísticos paramétricos, como a análise de variância (“oneway” anova) dos 3 experimentos, e método de Dunnett para dados pareados com grupo controle (TBT e Pb^{++}).

Através dos parâmetros área nuclear e IOD, foi possível obter gráficos relacionados a dispersão, que pode ser usada para interpretar se ocorre casos de poliploidia quando os gráficos apresentarem agrupamentos bem definidos (figura 1).

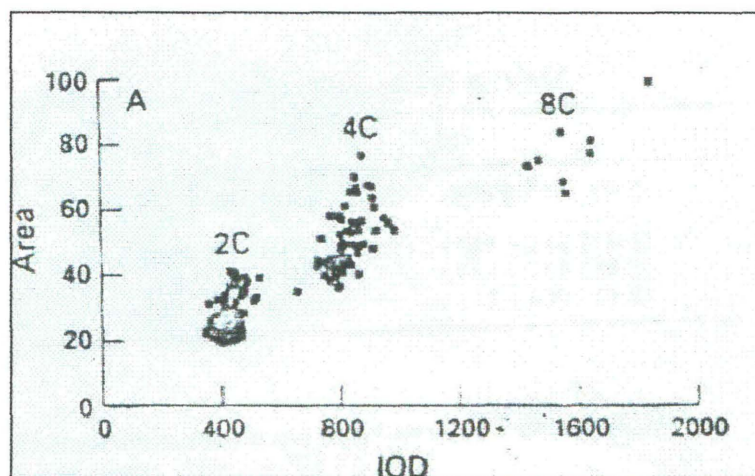


Figura 1 – Gráfico representativo de dispersão obtido através de “imprint” de núcleos de hepatócitos de ratos. Os agrupamentos bem definidos indicam a ocorrência de poliploidia. (Retirado de SMITH, *et al.* (1996).

Resultados

Esfericidade Nuclear

Os valores de média e erro padrão da média para o parâmetro esfericidade nuclear podem ser observados nas tabelas 3, 6 e 7 que correspondem ao valores obtidos dos experimentos com TBT, Pb^{++} e $HgCH_3^+$, respectivamente.

As análises de variância demonstraram haver diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as médias dos grupos dos contaminados com TBT (tabela 4) e com $HgCH_3^+$ (tabela 9). Porém, o mesmo não ocorreu com os grupos do experimento com o Pb^{++} , uma vez feita a análise de variância esta não apresentou valores significativamente diferentes entre as médias dos grupos. No experimento com o TBT, quando comparado ao controle (método de Dunnett) apenas para o grupo da segunda coleta, TBT II (8 doses), foi verificada uma diferença significativa (tabela 5), sendo que os núcleos deste grupo apresentam-se com forma menos esférica.

As figuras 2 (experimento com TBT), 3 (experimento com Pb^{++}) e 4 (experimento com $HgCH_3^+$) apresentam os valores de esfericidade nuclear, por grupo, destacando média, erro padrão da média e grande média. Os grupos cujos valores não diferem do controle estão evidenciados em vermelho.

Esfericidade – experimento com TBT

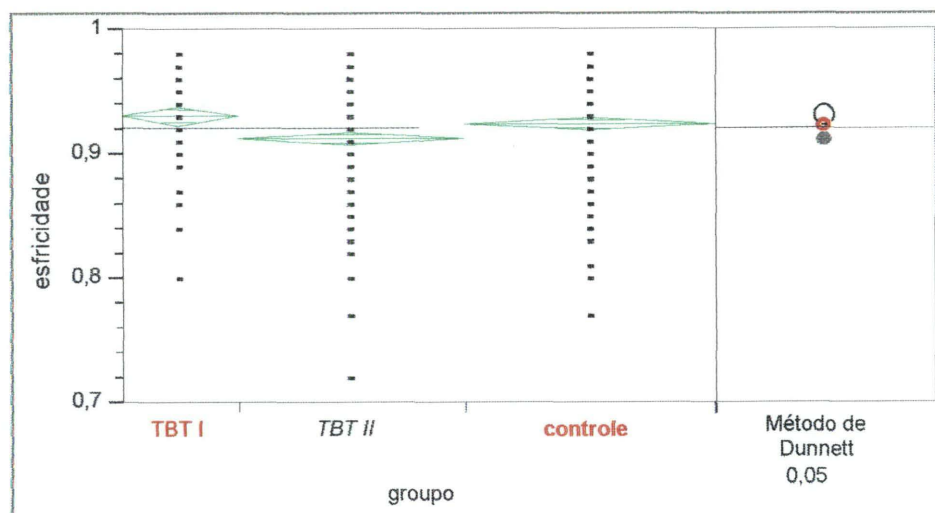


Figura 2 – Gráfico representativo da distribuição dos valores de esfericidade nuclear de hepatócitos de *Hoplias malabaricus* relativo ao experimento com TBT, destacando média, erro padrão da média e grande média. TBT I: indivíduos que receberam 4 doses e TBT II: indivíduos que receberam 8 doses. Legendas em vermelho representam grupos sem diferenças significativas em relação ao controle. À direita uma representação esquemática do resultado do teste de Dunnett.

Tabela 3 – Médias e Erros Padrão das Médias referentes ao parâmetro esfericidade nuclear do experimento com TBT. n = número de núcleos analisados

Tratamento	n	Média	Erro Padrão de Média
TBT I	107	0,930187	0,00368
TBT II	208	0,912356	0,00264
Controle	230	0,923826	0,00251

Tabela 4 – Análise de Variância (Oneway Anova) dos dados de esfericidade nuclear de indivíduos submetidos ao tratamento com TBT.

Fonte	GL	Soma dos Quadrados	Quadrado da Média	F Ratio	Prob > F
Tratamento	2	0,02636007	0,013180	9,1004	0,0001
Erro	542	0,78497498	0,001448		
C. Total	544	0,81133505			

Tabela 5 – Comparação de cada grupo com o controle (método de Dunnett) dos dados de esfericidade nuclear. Valores positivos mostram pares de médias que são significativamente diferentes.

	Controle
TBT I	-0,00356
Controle	-0,00791
TBT II	0,00336

Esfericidade – experimento com Pb^{++}

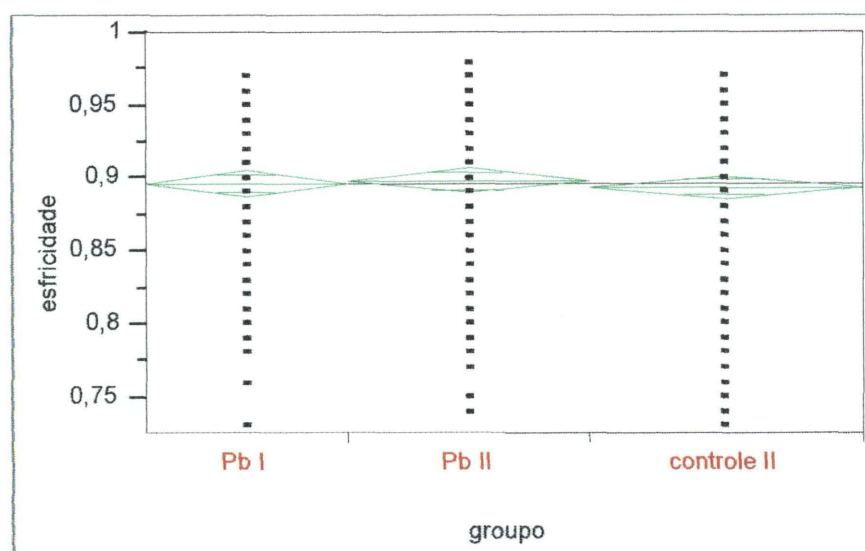


Figura 3 – Gráfico representativo da distribuição dos valores de esfericidade nuclear de hepatócitos de *Hoplias malabaricus* relativo ao experimento com Pb^{++} , destacando média, erro padrão da média e grande média. Pb^{++} I: indivíduos que receberam 4 doses e Pb^{++} II: indivíduos que receberam 8 doses. Legendas em vermelho representam grupos sem diferenças significativas em relação ao controle.

Tabela 6 – Médias e Erros Padrão das Médias referentes ao parâmetro esfericidade nuclear do experimento com Pb^{++} . n = número de núcleos analisados

Tratamento	n	Média	Erro Padrão de Média
Pb I	115	0,896522	0,00466
Pb II	136	0,898971	0,00429
Controle	153	0,894248	0,00404

Tabela 6 – Análise de Variância (Oneway Anova) dos dados de esfericidade nuclear de indivíduos submetidos ao tratamento com Pb^{++} .

Fonte	GL	Soma dos Quadrados	Quadrado da Média	F Ratio	Prob > F
Tratamento	2	0,0016058	0,000803	0,3213	0,7254
Erro	401	1,0020031	0,002499		
C. Total	403	1,0036089			

Esfericidade – experimento com HgCH_3^+

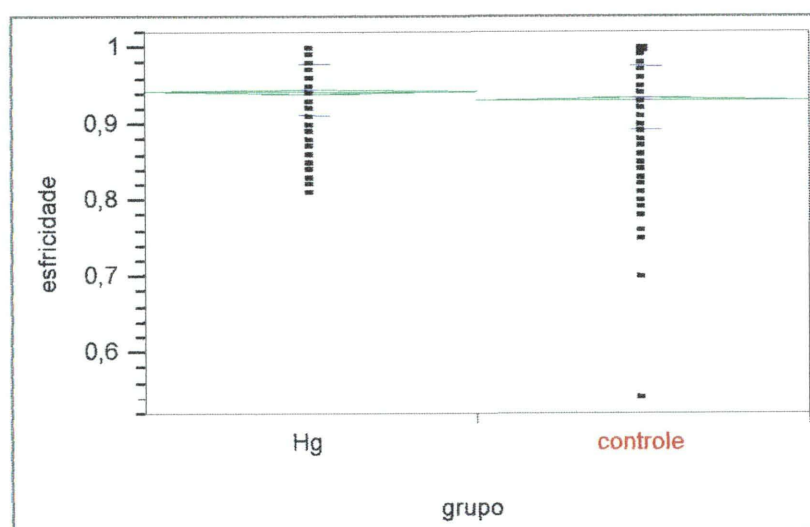


Figura 4– Gráfico representativo da distribuição dos valores de esfericidade nuclear de hepatócitos de *Hoplias malabaricus* relativo ao experimento com HgCH_3^+ , destacando média, erro padrão da média e grande média. Legendas em vermelho representam grupos sem diferenças significativas em relação ao controle.

Tabela 8 – Médias e Erros Padrão das Médias referentes ao parâmetro esfericidade nuclear do experimento com HgCH_3^+ . n = número de núcleos analisados

<i>Tratamento</i>	<i>N</i>	<i>Média</i>	<i>Erro Padrão da Média</i>
Hg	1645	0,943441	0,00082
Controle	1627	0,933663	0,00100

Tabela 9 – Análise de Variância (Oneway Anova) dos dados de esfericidade nuclear de indivíduos submetidos ao tratamento com HgCH_3^+ .

<i>Fonte</i>	<i>GL</i>	<i>Soma dos Quadrados</i>	<i>Quadrado da Média</i>	<i>F Ratio</i>	<i>Prob > F</i>
Tratamento	1	0,0781988	0,078199	57,0973	<0,0001
Erro	3270	4,4784929	0,001370		
C. Total	3271	4,5566917			

Área nuclear

Nas tabelas 10, 11 e 14 são encontrados os dados referentes à área nuclear que foram utilizados nos cálculos estatísticos, sendo que cada uma das tabelas correspondem a experimentos diferentes (tabela 10 – TBT, tabela 11 – Pb^{++} e tabela 14 – $HgCH_3^+$). Os valores encontrados nessas tabelas são representados graficamente nas figuras 5, 6 e 7, respectivamente.

A análise de variância realizada com os valores obtidos do experimento com TBT (tabela 11) aponta para diferença altamente significativa entre os grupos ($p < 0,0001$). Tanto as médias do grupo TBT I, quanto as do grupo TBT II, são significativamente diferentes da média do grupo controle (tabela 12).

Após a análise de variância (tabela 14), núcleos de hepatócitos da primeira coleta dos indivíduos tratados com Pb^{++} (Pb I, 4 doses), apresentaram os valores de área significativamente diferentes em relação ao controle, enquanto os da segunda coleta (Pb II, 8 doses), quando comparados com os valores do grupo controle, são considerados iguais, o que pode ser observado na tabela 15.

No experimento com $HgCH_3^+$, a possibilidade da média da área nuclear do grupo controle ser igual à do grupo tratado é $< 0,0001$ (tabela 17), ou seja, são significativamente diferentes. Os dados demonstram que a média da área nuclear dos indivíduos contaminados pelo $HgCH_3^+$ é significativamente menor que a média dos indivíduos controles.

Área Nuclear – experimento com TBT

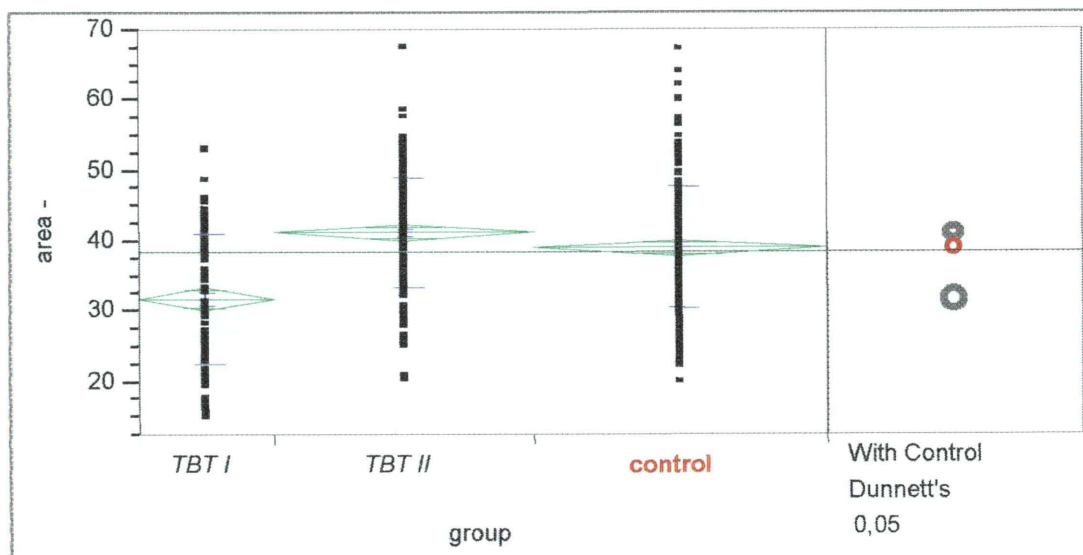


Figura 5 – Gráfico representativo da distribuição dos valores de área nuclear em μm^2 de hepatócitos de *Hoplias malabaricus* relativo ao experimento com TBT, destacando média, erro padrão da média e grande média. TBT I: indivíduos que receberam 4 doses e TBT II: indivíduos que receberam 8 doses. Legendas em vermelho representam grupos sem diferenças significativas em relação ao controle. À direita uma representação esquemática do resultado do teste de Dunnett.

Tabela 10 – Médias (em μm^2) e Erros Padrão das Médias referentes ao parâmetro área nuclear do experimento com TBT. n = número de núcleos analisados

Tratamento	N	Média	Erro Padrão da Média
TBT I	107	31,8387	0,88934
TBT II	206	41,2584	0,53716
Controle	229	39,1197	0,57257

Tabela 11 – Análise de Variância (Oneway Anova) dos dados de área nuclear de indivíduos submetidos ao tratamento com TBT.

Fonte	GL	Soma dos Quadrados	Quadrado da Média	F Ratio	Prob > F
Tratamento	2	6403,302	3201,65	45,0892	<0,0001
Erro	539	38272,840	71,01		
C. Total	541	44676,142			

Tabela 12 – Comparação de cada grupo com o controle (método de Dunnett) dos dados de área nuclear. Valores positivos mostram pares de médias que são significativamente diferentes.

	Controle
TBT II	0,3354
Controle	-1,7550
TBT I	5,0819

Área Nuclear – experimento com Pb^{++}

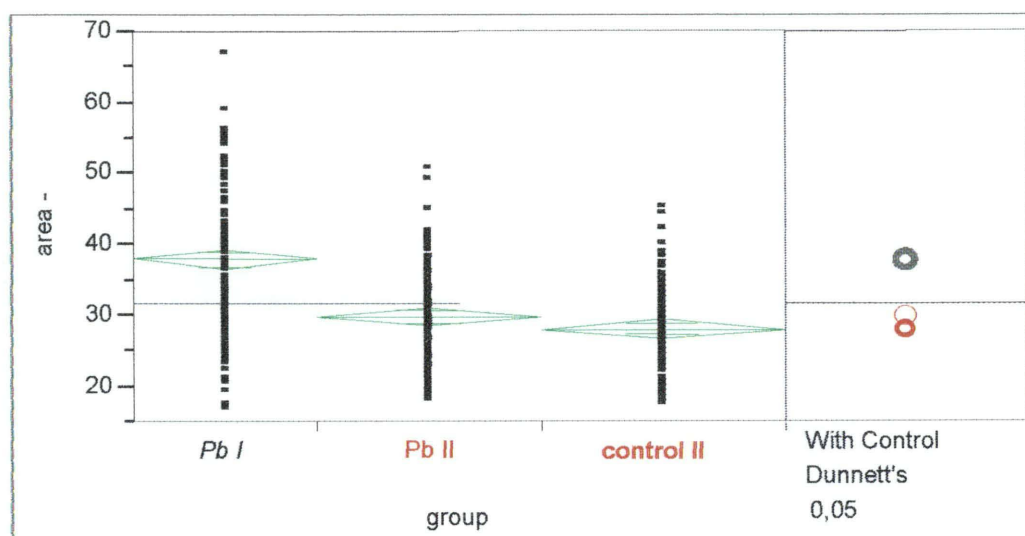


Figura 6 – Gráfico representativo da distribuição dos valores de área nuclear (μm^2) de hepatócitos de *Hoplias malabaricus* relativo ao experimento com Pb^{++} , destacando média, erro padrão da média e grande média. Pb^{++} I: indivíduos que receberam 4 doses e Pb^{++} II: indivíduos que receberam 8 doses. Legendas em vermelho representam grupos sem diferenças significativas em relação ao controle. À direita uma representação esquemática do resultado do teste de Dunnett.

Tabela 13 – Médias (em μm^2) e Erros Padrão das Médias referentes ao parâmetro área nuclear do experimento com Pb^{++} . n = número de núcleos analisados

Tratamento	N	Média	Erro Padrão da Média
Pb I	112	37,9507	0,71675
Pb II	134	29,9036	0,65527
Controle	147	28,1327	0,62563

Tabela 14 – Análise de Variância (Oneway Anova) dos dados de área nuclear de indivíduos submetidos ao tratamento com Pb^{++} .

Fonte	GL	Soma dos Quadrados	Quadrado da Média	F Ratio	Prob > F
Tratamento	2	6668,387	3334,19	57,9486	<0,0001
Erro	390	22439,479	57,54		
C. Total	392	29107,865			

Tabela 15 – Comparação de cada grupo com o controle (método de Dunnett) dos dados de área nuclear. Valores positivos mostram pares de médias que são significativamente diferentes.

	Controle
Pb I	7,7012
Pb II	-0,2449
Controle	-1,9686

Área Nuclear – experimento com HgCH_3^+

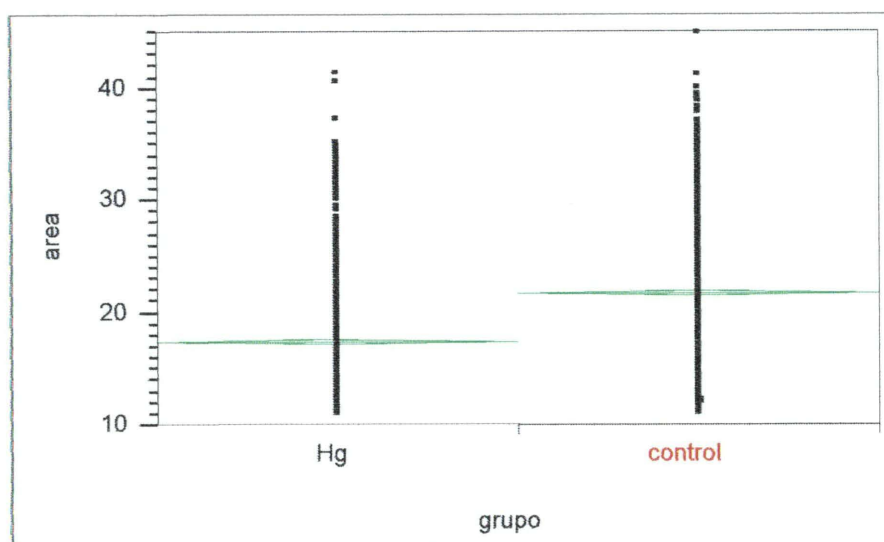


Figura 7 – Gráfico representativo da distribuição dos valores de área nuclear (em μm^2) de hepatócitos de *Hoplias malabaricus* relativo ao experimento com HgCH_3^+ , destacando média, erro padrão da média e grande média. Legendas em vermelho representam grupos sem diferenças significativas em relação ao controle.

Tabela 16 – Médias (em μm^2) e Erros Padrão das Médias referentes ao parâmetro área nuclear do experimento com HgCH_3^+ . n = número de núcleos analisados

Tratamento	N	Média	Erro Padrão da Média
Hg	1600	17,5170	0,12549
Controle	1600	21,7979	0,12549

Tabela 17 – Análise de Variância (Oneway Anova) dos dados de área nuclear de indivíduos submetidos ao tratamento com HgCH_3^+ .

Fonte	GL	Soma dos Quadrados	Quadrado da Média	F Ratio	Prob > F
Tratamento	1	14660,456	14660,5	581,8734	<0,0001
Erro	3198	80574,458	25,2		
C. Total	3199	95234,913			

Densidade óptica integrada (IOD)

A figura 8 representa graficamente os valores encontrados na tabela 18 relativos ao experimento com TBT. A análise de variância demonstra que os valores da IOD dos indivíduos do grupo TBT II aumentaram significativamente (tabela 19). Não foi encontrada diferença significativa entre os valores do grupo controle e do TBT I.

Os resultados do experimento com o Pb^{++} demonstram que os valores da IOD do grupo Pb I tiveram um aumento em relação aos valores do grupo controle (figura 9 e tabela 21). Como pode ser observado na tabela 22 os esses valores aumentaram significativamente, porém os valores do grupo Pb II (8 doses) são considerados iguais aos do grupo controle.

Podem ser observados na tabelas 20 e 23, experimento com TBT e experimento com Pb^{++} , respectivamente, os pares das médias da IOD dos grupos que são significativamente diferentes em relação aos grupos controles.

Os valores da IOD dos indivíduos tratados com $HgCH_3^+$ apresentaram uma diferença significativa ($p < 0,0001$) em relação ao controle, como pode ser observado na tabela 25. Os valores obtidos através da análise estatística desse parâmetro estão representados na figura 10 graficamente e na tabela 24. Como pode ser observado na figura 10 e na tabela 24 houve uma diminuição dos valores da IOD dos núcleos de hepatócitos tratados com $HgCH_3^+$ quando comparados aos valores dos controles.

Densidade Óptica Integrada (IOD) – experimento com TBT

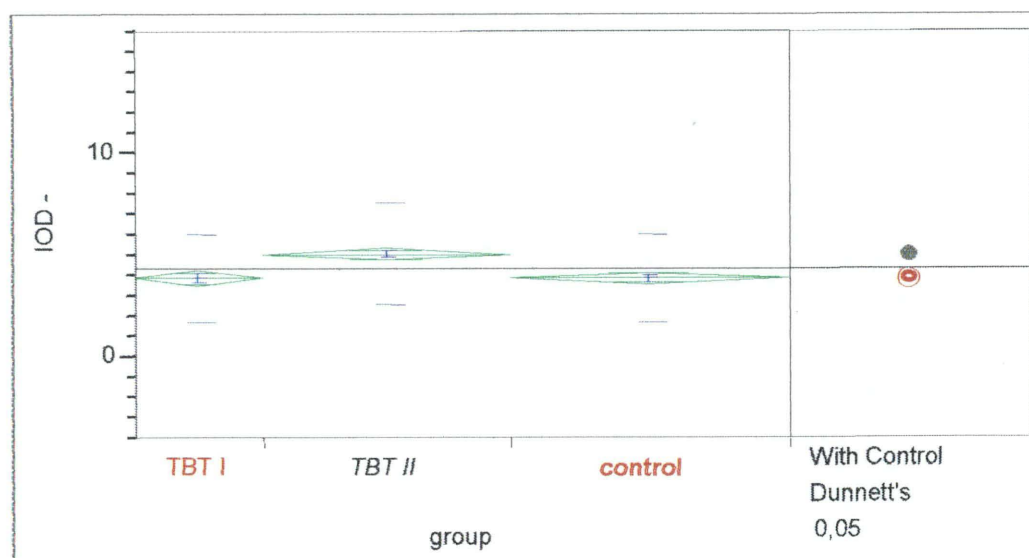


Figura 8 – Gráfico representativo da distribuição dos valores da IOD de hepatócitos de *Hoplias malabaricus* relativo ao experimento com TBT, destacando média, erro padrão da média e grande média. TBT I: indivíduos que receberam 4 doses e TBT II: indivíduos que receberam 8 doses. Legendas em vermelho representam grupos sem diferenças significativas em relação ao controle. À direita uma representação esquemática do resultado do teste de Dunnett.

Tabela 18 – Médias e Erros Padrão das Médias referentes ao parâmetro IOD do experimento com TBT. n = número de núcleos analisados

Tratamento	n	Média	Erro Padrão da Média
TBT I	107	3,89815	0,21308
TBT II	206	5,09612	0,17210
Controle	229	3,90892	0,14259

Tabela 19 – Análise de Variância (Oneway Anova) dos dados da IOD de indivíduos submetidos ao tratamento com TBT.

Fonte	GL	Soma dos Quadrados	Quadrado da Média	F Ratio	Prob > F
Tratamento	2	181,0444	90,5222	17,2577	<0,0001
Erro	539	2827,2278	5,2453		
C. Total	541	3008,2722			

Tabela 20 – Comparação de cada grupo com o controle (método de Dunnett) dos dados da IOD. Valores positivos mostram pares de médias que são significativamente diferentes.

	Controle
TBT II	0,69708
Controle	-0,47699
TBT I	-0,58692

Densidade Óptica Integrada (IOD) – experimento com Pb^{++}

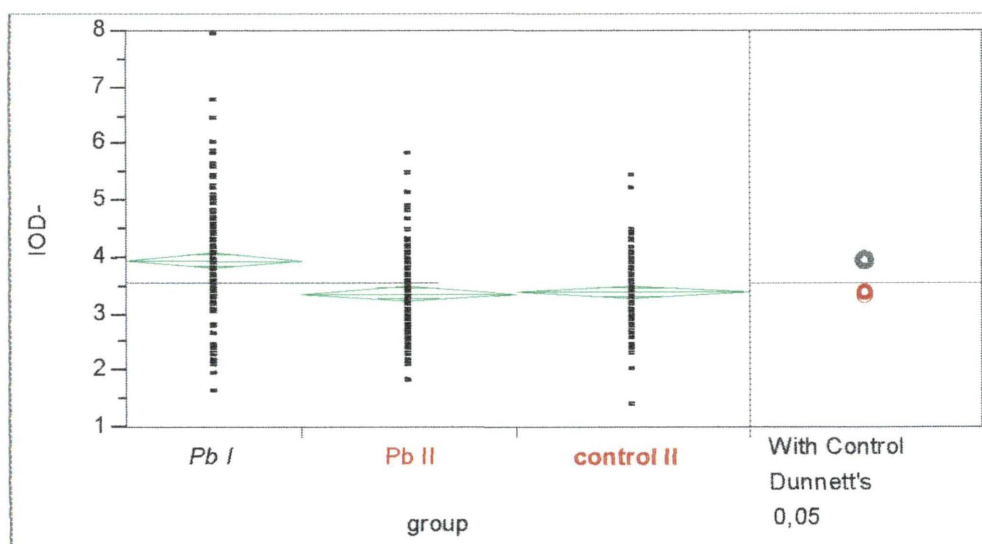


Figura 9 – Gráfico representativo da distribuição dos valores da IOD de hepatócitos de *Hoplias malabaricus* relativo ao experimento com Pb^{++} , destacando média, erro padrão da média e grande média. Pb^{++} I: indivíduos que receberam 4 doses e Pb^{++} II: indivíduos que receberam 8 doses. Legendas em vermelho representam grupos sem diferenças significativas em relação ao controle. À direita uma representação esquemática do resultado do teste de Dunnett.

Tabela 21 – Médias e Erros Padrão das Médias referentes ao parâmetro IOD do experimento com Pb^{++} . n = número de núcleos analisados

Tratamento	n	Média	Erro Padrão da Média
Pb I	112	3,94884	0,07469
Pb II	134	3,35781	0,06829
Controle	147	3,39517	0,06520

Tabela 22 – Análise de Variância (Oneway Anova) dos dados da IOD de indivíduos submetidos ao tratamento com Pb^{++} .

Fonte	GL	Soma dos Quadrados	Quadrado da Média	F Ratio	Prob > F
Tratamento	2	26,25240	13,1262	21,0065	<0,0001
Erro	390	243,69659	0,6249		
C. Total	392	269,94899			

Tabela 23 – Comparação de cada grupo com o controle (método de Dunnett) dos dados da IOD. Valores positivos mostram pares de médias que são significativamente diferentes.

	Controle
Pb I	0,33307
Controle	-0,20516
Pb II	-0,17272

Densidade Óptica Integrada (IOD) – experimento com HgCH_3^+

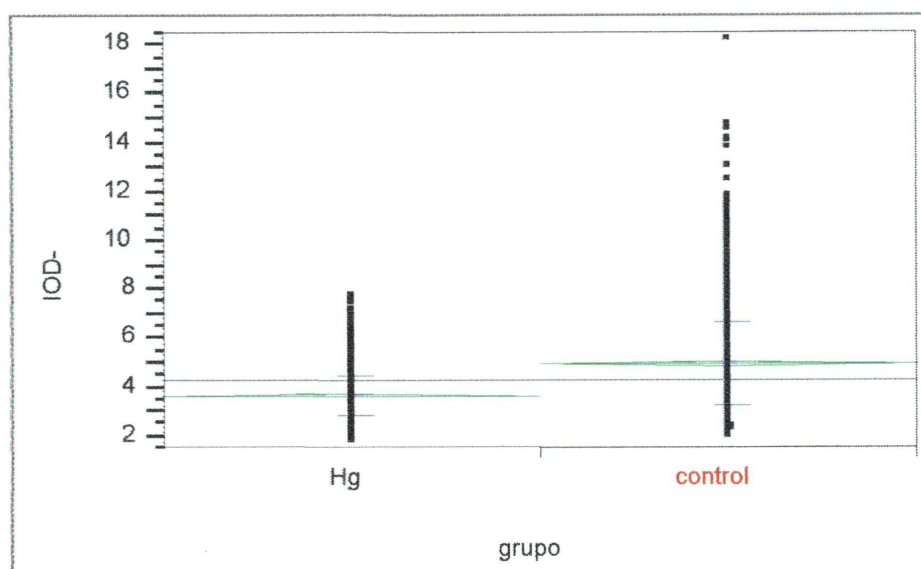


Figura 10 – Gráfico representativo da distribuição dos valores da IOD de hepatócitos de *Hoplias malabaricus* relativo ao experimento com HgCH_3^+ , destacando média, erro padrão da média e grande média. Legendas em vermelho representam grupos sem diferenças significativas dos dados.

Tabela 24 – Médias e Erros Padrão das Médias referentes ao parâmetro IOD do experimento com HgCH_3^+ . n = número de núcleos analisados

Tratamento	n	Média	Erro Padrão da Média
Hg	1600	3,67011	0,02095
Controle	1600	4,95334	0,04309

Tabela 25 – Análise de Variância (Oneway Anova) dos dados da IOD de indivíduos submetidos ao tratamento com HgCH_3^+ .

Fonte	GL	Soma dos Quadrados	Quadrado da Média	F Ratio	Prob > F
Tratamento	1	1317,3416	1317,34	717,1882	< 0,0001
Erro	3198	5874,1322	1,84		
C. Total	3199	7191,4738			

Dispersão (área x IOD)

Os gráficos de dispersão de área em relação à IOD estão apresentados nas figura 11 (*a* – TBT, *b* – Pb^{++} e *c* – HgCH_3^+).

Em nenhum deles se observam agrupamentos que possam indicar a ocorrência de poliploidia; de maneira geral, a dispersão de valores para os grupos controle é maior que para os tratados, salvo para o grupo de chumbo que recebeu menor número de doses.

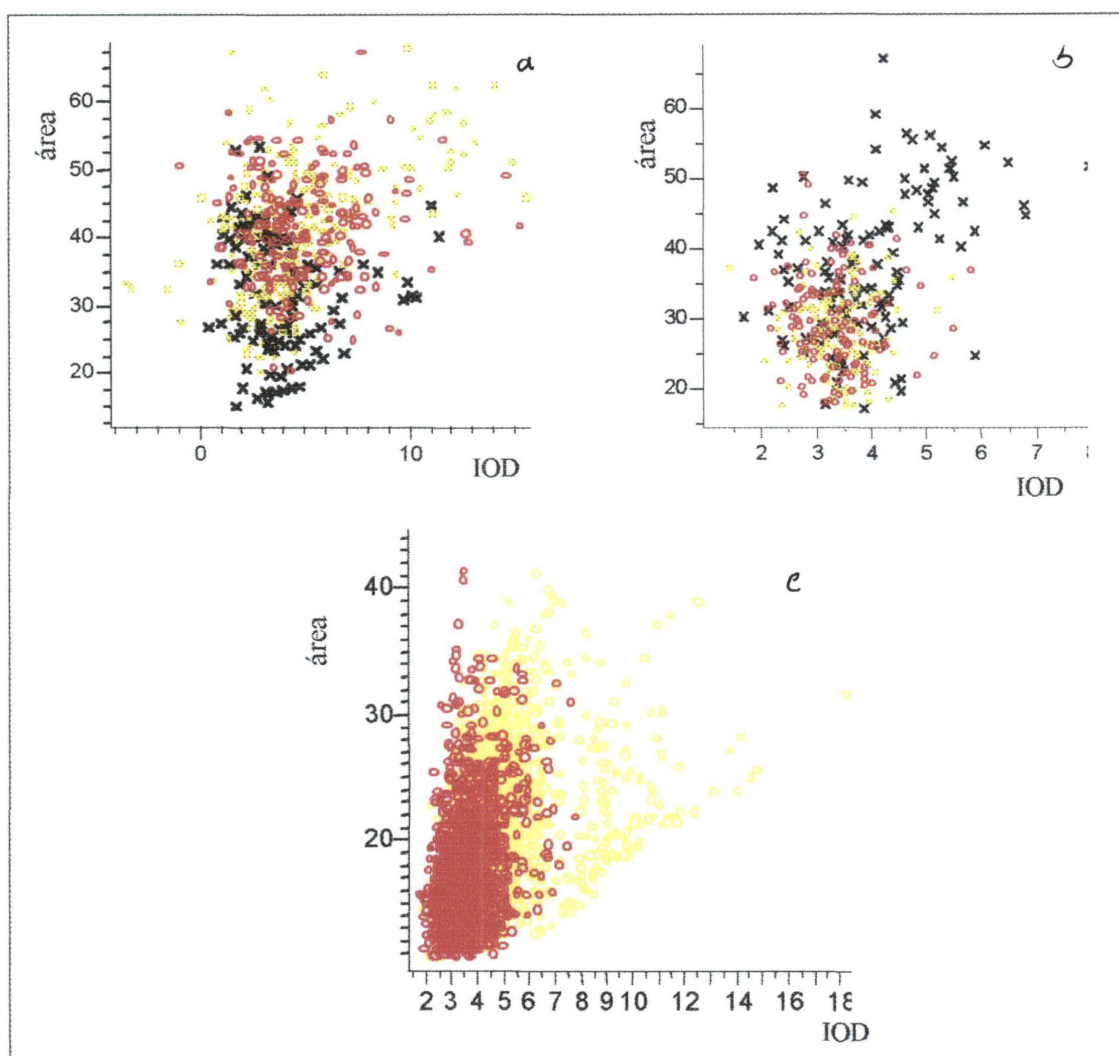


Figura 11 – Gráficos de dispersão. *a*) experimento com TBT; *b*) experimento com Pb^{++} ; *c*) experimento com HgCH_3^+ . Os pontos amarelos correspondem aos valores dos indivíduos controles, pretos aos tratados com 4 doses e vermelhos aos tratados com 8 doses, no caso do experimento com HgCH_3^+ os pontos vermelhos correspondem aos valores dos indivíduos tratados com 12 doses.

Métodos de Captura de Imagens

Os 3 equipamentos utilizados para a captura de imagens ofereceram imagens com diferentes qualidades (figura 12). As imagens capturadas através do equipamento para análise de imagens do Departamento de Zoologia (figura 12c) foram as que apresentaram melhor contraste entre o fundo e as imagens dos núcleos de hepatócitos, bem como uma homogeneidade do fundo em todo o campo visual.

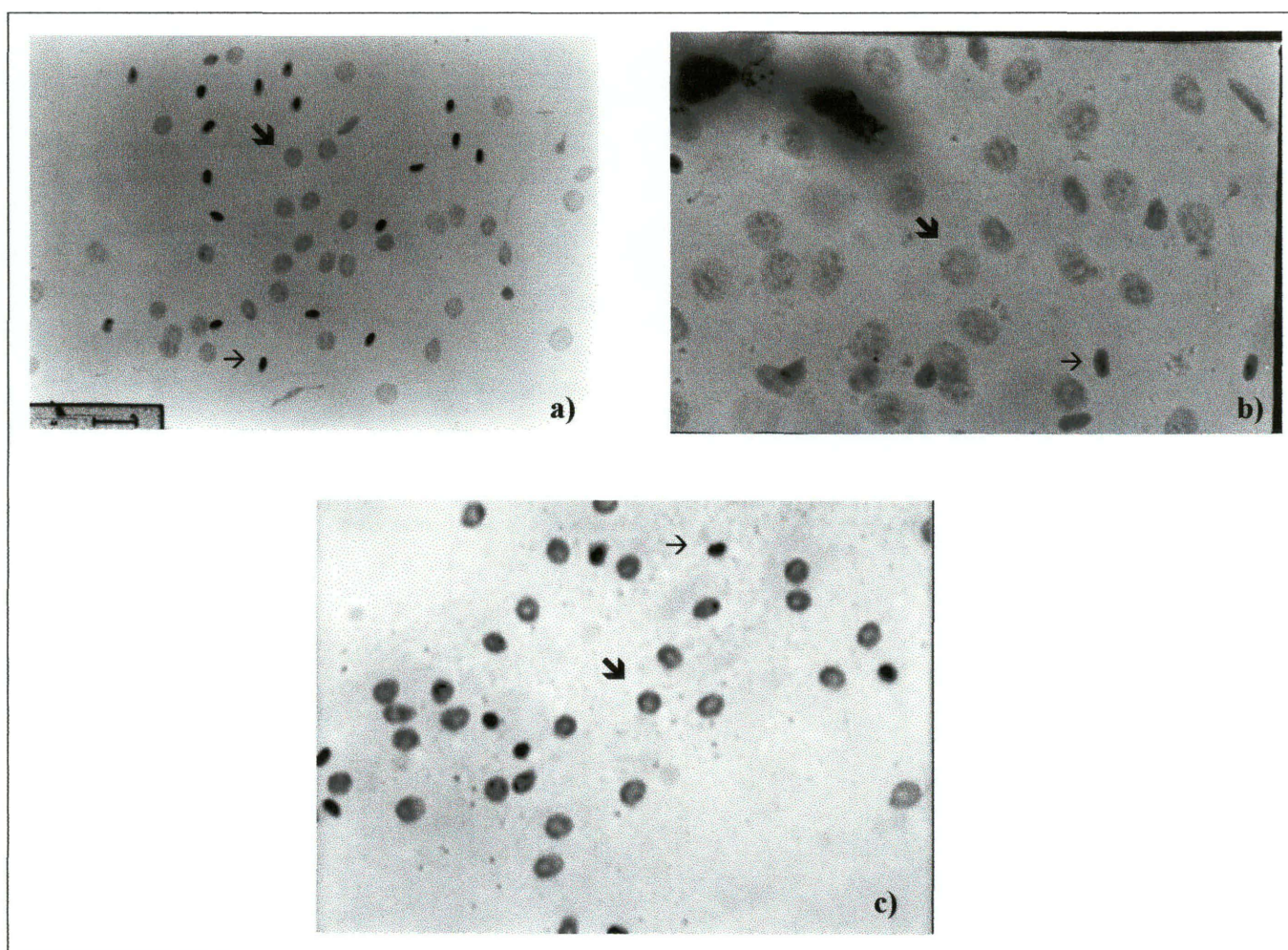


Figura 12 – ➤ núcleos de hepatócitos e → núcleos de eritrócitos de indivíduos controles. a) imagem do experimento com TBT fotografada sob fotomicroscópio Zeiss Axiophot, objetiva de 63x. b) imagem do experimento com Pb^{++} fotografada sob fotomicroscópio Olympus, objetiva de 100x. c) imagem do experimento com $HgCH_3^+$ capturada através do equipamento para análise de imagens, objetiva de 40x.

Discussão

Análise dos parâmetros esfericidade, área nuclear e IOD

A esfericidade dos núcleos de hepatócitos de *H. malabaricus* submetidos aos tratamentos com TBT, com maior tempo de exposição, e com HgCH_3^+ se mostrou alterada, sendo esse um importante parâmetro que pode ser utilizado como biomarcador para experimentos em que o TBT ou o HgCH_3^+ sejam os contaminantes. Porém, o mesmo não pode ser afirmado para o Pb^{++} com o método aqui empregado, pois os resultados para os grupos que tinham esse metal como contaminante não apresentaram alterações significativas na esfericidade nuclear dessas células, a exposição de 8 doses ao contaminante não foi o suficiente para provocar a deformação do núcleo ou o Pb^{++} não promove alteração na forma do núcleo. No caso do TBT, após ministradas 8 doses do contaminante o resultado para esfericidade foi significativamente diferente do controle, o que pode ser um indicativo de que o animal sofre maiores alterações quanto maior o tempo de exposição a esse xenobionte. Alterações na forma nuclear podem ter origem em alterações do citoesqueleto (CIMA E BALLARIN, 1999) ou da distribuição do material genético a partir de alterações na matriz nuclear. Testes futuros neste laboratório tentarão confirmar a participação do citoesqueleto na modificação da forma nuclear.

Através da análise dos resultados pelo método de Dunnett, pode-se inferir uma possível perda do material nuclear dos indivíduos tratados com 4 doses de TBT, pois a área nuclear diminui, e esse parâmetro se relaciona com o volume nuclear. Porém, essa hipótese fica comprometida pois os dados obtidos da segunda coleta (8 doses) mostram que a área nuclear de hepatócitos de indivíduos contaminados é significativamente maior que a área nuclear dos controles, de maneira diferente dos indivíduos que sofreram um número menor de doses, e pelos dados da IOD.

A densidade óptica integrada (IOD) é um parâmetro de análise direta do conteúdo de DNA, uma vez que relaciona a absorbância nuclear e sua área. Os dados da IOD do experimento com TBT, quando relacionado com os dados de área

nuclear, demonstram que pode ter ocorrido uma compactação da cromatina dos indivíduos tratados com 4 doses. Os núcleos desses indivíduos apresentaram redução nos valores de área (e portanto do volume nuclear) enquanto os valores da IOD dos contaminados são considerados iguais aos dos controles. Com a compactação do núcleo pode estar ocorrendo desativação de parte do DNA, pois formas mais compactadas da cromatina são resistentes à iniciação da transcrição e da duplicação. O DNA compactado dificulta a ação de enzimas responsáveis pela duplicação do material genético bem como a síntese de RNAs (ALBERTS *et al.*, 1997). A compactação da cromatina pode, também, indicar um início de apoptose ou estar presente em processos de necrose.

Analisando resultados da IOD da segunda coleta pode-se sugerir que ocorreu um processo de amplificação gênica, uma vez que os valores obtidos dos contaminados foram significativamente maiores que dos controles. Segundo SUZUKI *et al.* (1992), existem mecanismos celulares que garantem o suprimento adequado dos produtos gênicos vitais para célula e, quando esse mecanismo inclui um aumento do número de cópias gênicas na célula, é conhecido como amplificação. A amplificação de DNA também está relacionada às células neoplásicas. Frequentemente, o DNA amplificado contém um ou um grupo de genes específicos, que por vezes recebem o nome de genes de “resistência multidroga” (*mdr1*), que codificam para ATPases de transporte ligadas à membrana plasmática que aparentemente previnem o acúmulo intracelular de certas classes de drogas lipofílicas, bombeando a droga para fora da célula (ALBERTS *et al.*, 1997). O mesmo pode estar ocorrendo nas células contaminadas com TBT, uma vez que sua molécula é lipossolúvel.

No experimento com Pb^{++} , primeiramente ocorre um grande aumento no valor de área média nuclear e, após um tempo maior de exposição ao contaminante, a área média nuclear dos indivíduos tratados com o metal volta a ser praticamente igual à área média dos indivíduos controle. Situação semelhante ocorre com os valores relacionados à IOD. Acredita-se que essa volta aos valores iniciais da área nuclear e IOD pode corresponder ao surgimento de tolerância à presença do chumbo no organismo. Contudo, não se pode considerar que o peixe esteja livre da

contaminação. Existem duas hipóteses para explicar o aumento da IOD nos núcleos dos hepatócitos dos indivíduos contaminados com 4 doses: 1) pode ter ocorrido o processo de amplificação gênica no início das contaminações, sendo que após um determinado período o processo de tolerância fez as células retornarem a suas atividades normais; 2) o Pb^{++} que penetrou no núcleo pode ter interferido na análise dos parâmetros área nuclear e IOD; como a IOD está relacionada com a intensidade de coloração, o chumbo presente no núcleo pode aumentar o valor desse parâmetro. Após uma exposição maior ao contaminante, o núcleo pode ter ativado algum mecanismo para impedir a entrada ou mesmo para expulsar o metal, resultando que os dados dos núcleos contaminados com 8 doses fossem iguais aos do controle.

O valor médio de área nuclear dos indivíduos contaminados pelo $HgCH_3^+$ apresentou uma diminuição significativa em relação aos controles. Como esse parâmetro está relacionado com o volume nuclear, pode-se supor, assim como foi suposto para o TBT, que o $HgCH_3^+$ provoca perda de material nuclear ou aumento na compactação da cromatina no núcleo.

No experimento com $HgCH_3^+$, os dados da IOD demonstram que pode ter havido perda de DNA, pois o valor desse parâmetro decai significativamente entre os indivíduos tratados. Como descrito, o material foi corado com a reação de Feülgen, específica para DNA e estequiométrica nas concentrações dessa molécula (VIDAL & MELLO, 1987). Dessa maneira, pode-se supor que houve diminuição da quantidade de DNA, que pode ocorrer através de quebras da molécula provocadas pelo contaminante. Como o DNA perdido não pode ser recuperado, as atividades de transcrição podem estar comprometidas afetando a célula como um todo e, consequentemente, o organismo. A perda de material genético também pode estar indicando um processo de apoptose.

Os resultados demonstram que organismos expostos por um certo período a metais pesados podem apresentar alterações nucleares. Consequentemente, se a contaminação se estender por um longo período, essas alterações poderão comprometer a fisiologia do animal e eventualmente de quem dele se alimenta.

Dispersão (área x IOD)

Através dos gráficos de dispersão, pode-se analisar se ocorre poliploidia em diferentes tipos celulares. Para que grupos de valores possam ser considerados agrupamentos distintos, seria necessário um aumento proporcional das duas variáveis. Uma vez duplicado o material genético, e este realizando suas atividades normais, a área nuclear também deve aumentar numa mesma proporção.

Em estudo com hepatócitos de rato e células cancerosas de mama humana, SMITH *et al.* (1996) demonstraram graficamente agrupamentos indicando que o material genético aumentou 2 e até 4 vezes. Isso não foi observado em hepatócitos de *H. malabaricus*. Após a análise, verificou-se que os valores de área nuclear, tanto de indivíduos controles quanto de indivíduos contaminados para os 3 experimentos, são muito variáveis, não podendo estabelecer uma boa correlação entre esses valores.

Os gráficos do experimento com TBT e do experimento com Pb^{++} são os que apresentam os valores mais dispersos tanto para área como para IOD. Também não é possível distinguir claramente agrupamentos que diferenciem indivíduos controles e contaminados nesses dois experimentos. Pode-se então supor que estejam ocorrendo fenômenos de aneuploidias ou de amplificação gênica, mas não de poliploidia, como resposta das células aos tratamentos.

Como já descrito anteriormente (resultados), os valores representados no gráfico de dispersão relacionado ao experimento com $HgCH_3^+$ não são considerados agrupamentos, porque além de formar apenas um grupo de valores dos núcleos de indivíduos contaminados, os valores apresentados são muito variáveis para o parâmetro área nuclear, portanto não se pode estabelecer uma proporção entre os valores de área nuclear e da IOD.

Métodos de captura de imagens

Para estabelecer uma comparação entre os métodos de captura de imagens foram analisadas quais as vantagens e desvantagens em relação ao tipo de lente da objetiva do microscópio (apocromática ou planapocromática), contraste entre o

fundo e o objeto, resolução da imagem obtida, tempo utilizado para captura e custo (tabela 26).

Tabela 26 – comparação entre os aparatos utilizados para a captura de imagens e os itens analisados. ↑: vantagem ↓: desvantagem.

	<i>Fotomicroscópio Zeiss Axiophot (lente planapocromática)</i>	<i>Fotomicroscópio Olympus (lente planacromática)</i>	<i>Equipamento para análise de imagens (lente planapocromática)</i>
<i>Lente</i>	↑↑	↓	↑↑
<i>Contraste</i>	↓	↓	↑↑
<i>Resolução</i>	↑	↑	↓
<i>Tempo</i>	↑	↑	↓↓
<i>Custo</i>	↑	↑	↓↓

Uma lente planapocromática, além de corrigir aberrações esférica para 4 comprimentos de onda (λ) e cromática para mais de 4λ , tem correção para curvatura de campo e abertura numérica alta (1,4), resultando em alta resolução da imagem (INOUE, S. & SPRING, K. R., 1997). Dessa maneira, a lente planapocromática aproxima um pouco mais a imagem projetada de um objeto à realidade, sendo portanto, mais indicada para a captura de imagens.

As imagens que apresentaram um melhor contraste entre o fundo e os objetos, foram as obtidas pelo equipamento para análise de imagens. Isso se deve ao fato de ser possível calibrar o brilho e o contraste das imagens, pelo computador, no exato momento da captura, permitindo-se o uso de toda a faixa de tons de cinza (256) na captura; uma imagem fotográfica, apesar de ter qualidade superior em resolução, muitas vezes tem a limitação do contraste por não permitir o tipo de controle acima referido (figura 12).

Um outro item analisado foi a resolução da imagem obtida. Uma imagem apresenta uma melhor resolução quando é revelada e ampliada, o que é obtido através de uma fotografia. Porém, quando essa fotografia é digitalizada (através de um “scanner”) ela perde um pouco da sua resolução, dependendo do tipo de equipamento utilizado e de sua calibração. Portanto, esse parâmetro apresenta a

mesma qualidade para os 3 métodos de captura, uma vez que a imagem obtida pelo equipamento para análise de imagens é diretamente digitalizada.

O menor tempo e menor custo para realizar todo o processo de captura foi obtido pelo equipamento para análise de imagens, pois as imagens são diretamente digitalizadas. Nesse caso, não há custos com filmes fotográficos nem revelação, e também não é necessário aguardar o tempo de revelação das fotografias. Depois de reveladas as fotos precisam ser digitalizadas, o que leva um pouco mais de tempo. Com a digitalização direta é possível obter um número maior de imagens em menos tempo e com baixo custo.

É importante deixar claro que uma boa captura não depende somente do equipamento utilizado para obter a imagem de um objeto. No caso do material obtido através de “imprint”, este deve ser realizado de maneira correta em uma lâmina bem limpa. Para corar o material deve ser utilizado um corante de boa qualidade e a montagem da lâmina deve ser cuidadosa.

Conclusões

- A morfometria nuclear pode ser usada como um bom biomarcador em estudos com *Hoplias malabaricus*.
- Os compostos TBT e HgCH_3^+ e Pb^{++} podem ser considerados agentes indutores de modificações (compactação, perda de material genético) na cromatina de hepatócitos de *Hoplias malabaricus*.
- Dos parâmetros analisados, os indivíduos tratados com Pb^{++} não tiveram os valores relacionados à esfericidade alterados.
- Há uma recuperação da forma nuclear controle quando o peixe é submetido a longo tempo de exposição ao Pb^{++} .
- Os núcleos de hepatócitos de *Hoplias malabaricus* não apresentaram poliploidia, em condições normais ou mesmo quando submetidos aos tratamentos em questão.
- O melhor método de captura de imagens, dentre os utilizados, foi com o equipamento para captura direta e análise de imagens do Departamento de Zoologia da Universidade Federal do Paraná.

Referências Bibliográficas

- ADAMS, S. M. (1990). Status and use of biological indicators for evaluating the effects of stress on fish. **Am. Fish. Soc. Symp.**, 8: 1-8.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, RALF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. (1997). **Biologia Molecular da Célula**. 3ª ed. Artes Médicas. Porto Alegre, RS.
- BAHNICK, D.; SAUER, C.; BUTTERWORTH, B.; KUEHL, D. W. (1994). A national study of mercury contamination of fish. IV: analytical methods e results. **Chemosphere**. Vol. 29, N.º 3, pp. 537-546.
- BAXES, G. A. (1994). Image Analysis. In: **Digital Image Processing** (John Wiley & Sons Ltd., eds.). p.123.
- BRABO, E. S.; SANTOS, E. O.; JESUS, I. M.; MASCARENHAS, A. F. S.; FAIAL K. F. (2000). Mercury contamination of fish and exposures of indigenous community in Pará state, Brazil. **Environmental Research Section A**, 84: 197-203.
- CETESB (COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL) (1991). **Avaliação da qualidade das águas do rio Ribeira de Iguape: considerações preliminares**. São Paulo: Relatório da CETESB.
- CIMA, F. & BALLARIN, L. (1999). TBT-Induced Apoptosis in Tunicate Haemocytes. **Applied Organometallic Chemistry**, 13: 697-703.
- CLARKSON, T. W. (1992). Human health risks from methylmercury in fish. **Environ. Toxicol. Chem.**, 9: 957-961.
- COOPER, G. P. & STEINBERG, D. (1977). Effects of cadmium and lead on adrenergic neuromuscular transmission in the rabbit. **Am. J. Physiol.**, 232: 128-131.
- CORDEIRO, R. C.; TURCO, B.; RIBEIRO, M. G.; LACERDA, L. D.; CAPITANEO, J.; OLIVEIRA DA SILVA, A.; SIFEDDINE, A.; TURCO, P. M. (2002). Forest fire indicators and mercury deposition in an intense land use change region in the Brazilian Amazon (Alta Floresta, MT). **The Science of the Total Environment**, 293: 247-256.
- EYSINK, G. G. J.; MARTINS M. C.; VARGAS BOLDRINI, C.; NAVAS-PEREIRA, D. (1990). Metais pesados em organismos aquáticos do rio Ribeira de Iguape e do complexo estuarino-lagunar Iguape-Cananéia: avaliação preliminar. In: **SIMPÓSIO DE ECOSSISTEMAS DA COSTA SUL E SUDESTE BRASILEIRA: estrutura, função e manejo** (2.: 1990: Águas de Lindóia). **Anais**, 2: 417-443.

EYSINK, G. G. J.; PÁDUA, H. B.; MARTINS, M. C. (1988). Presença do mercúrio no ambiente. **Ambiente**, 2: 43-49.

EYSINK, G. G. J.; PÁDUA, H. B.; PIVA-BERTOLETTI, S. A. M.; MARTINS M. C.; NAVAS-PEREIRA, D.; ROBERTO, S. (1988). Metais pesados no vale do Ribeira e em Iguape-Cananéia. **Ambiente**, 2: 6-13.

FENT, K. & BUCHELI, T. D. (1994). Inhibition of hepatic microsomal monooxygenase system by organotins in vitro in fish. **Aquatic. Toxicol.**, 28: 107-126.

FENT, K. & HUNN, J. (1995). Organotins in freshwater harbors and rivers: temporal distribution, annual trends and fate. **Envir. Toxicol. Chem.**, 14: 1123-1145.

FENT, K. & STEGMAN, J. J. (1993). Effects of tributyltin in vivo on hepatic cytochrome P450 forms in marine fish. **Aquatic. Toxicol.**, 24: 219-240.

HINTON, D. E. (1990). Histological techniques. In: C. B. Schreck and P.B. Moyle (Editors). **Biological Methods in Fisheries. American Fisheries Society Special Publications Series**, pp. 191-211.

INOUE, S.; SPRING, K. R. (1997). **Video microscopy: the fundamentals**. 2^a ed. Plenum Press. New York, NY. p.50

JOHNSON, L. L.; STEHR, C. M.; OLSON, O. P.; MYERS, M. S.; PIERCE, S. M.; WIGREN, C. A.; MCCAIN, B. B.; VARANASI, U. (1993). Chemical Contaminants and Hepatic Lesions in Winter Flounder (*Pleuronectes americanus*) from the Northeast Coast of the United States. **Environ. Sci. Technol**, 27: 2759-2771.

KLAASSEN, C. D. (1987). Metais pesados e seus antagonistas. In: GILMAN, A. G.; GOODMAN, L. S.; RALL, T. W.; MURAD, R. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 7.^a ed. Guanabara. Rio de Janeiro, RJ. pp. 1053-1068.

KOBER, T. E. & COOPER, G. P. (1976). Lead competitively inhibits calcium-dependent synaptic transmission in the bullfrog sympathetic ganglion. **Nature**, 262:704- 705.

KRANJC, I.; WEBSTER, P. W.; LOEBER, J. G.; VAN LEEUWEN, F. X. R.; VOS, J. G.; VAESSEN, H. A. M. G.; VAN DER HEIJDEN, C. A. (1984). Toxicity of bis(tri-n-butyltin)oxide in the rat. 1. Short-terms effects on general parameters and on the endocrine and lymphoid systems. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, 75: 363-386.

LOPEZ, P. A.; FENOCCHIO, A. S. (1994). Confirmation of two different cytotypes for the neotropical fish *Hoplias malabaricus* (Gill, 1903) (Characiformes). **Cytobios**, v.80, 217-221.

- LOUREIRO, V. E. (1995). Dieta e atividade alimentar de *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Osteichthyes, Erythrinidae) do reservatório da UHE de Segredo, PR, no primeiro ano de sua formação. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE ICTIOLOGIA (XI.: 1995: Campinas). **Resumos**. Campinas: PUC, 6-10 fev., L4, p.12.
- LOWE-MCCONNELL, R. H. (1999). **Estudos ecológicos de comunidades de peixes Neotropicais**. São Paulo: EDUSP.
- MALM, O.; CASTRO, M. B.; BASTOS, W. R.; BRANHES, F. J. P.; ZUFTO, C. E.; PFEIFFER, W. C. (1993). Mercury in fish samples from different goldmining areas, Amazon, Brazil. **Int. Conference Heavy Metals in the Environment**. Toronto. Vol. 2: 96-99.
- MANALIS, R. S. & COOPER, G. P. (1973). Presynaptic and postsynaptic effects of lead at the frog neuromuscular junction. **Nature**, 243:354- 355.
- MELLO, M. L. S. & VIDAL, B. C. (1980). Reação de Feülgen. In: **Práticas de Biologia Celular**. Edgar Blücher. Campinas, SP. p. 57.
- OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; BELGER, L.; PELLETIER, É.; ROULEAU, C. (2002). Histopathological evidence of inorganic mercury and methyl mercury toxicity in the arctic charr (*Salvelinus alpinus*). **Environmental Research** 90: 217-225.
- OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; PELLETIER, É.; PFEIFFER, W. C.; ROULEAU, C. (2000). Comparative uptake, bioaccumulation, and gill damages of inorganic mercury in tropical and nordic freshwater fish. **Environmental Research Section A**, 83: 286-292.
- OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; SCHATZMANN, M.; SILVA DE ASSIS, H. C.; SILVA, W. P. H.; PELLETIER, É.; AKAISHI F. M. (2002). Evaluation of tributyltin subchronic effects in tropical freshwater fish (*Astyanax bimaculatus*, Linnaeus, 1758). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 51: 161-167.
- PELLETIER, É. (1995). Environmental Organometallic Chemistry of Mercury, Tin and lead: Present Status and Perspectives. In: **Metal Especiation and Bioavailability in Aquatic Systems** (Tessier, A. & Turner, D. R., eds.). John Wiley et Sons Ltd., p.103-148.
- PIENTA, K. J. & COFFEY, D. S. (1991). Correlation of nuclear morphometry with progression of breast cancer. **Cancer**, 68: 2012-2016.
- SEGNER, H. & BRAUNBECK, T. (1988). Hepatocellular adaptation to extreme nutritional conditions in ide. *Leuciscus idus melanotus* L. (Cyprinidae). A morphofunctional analysis. **Fish Physiol., Biochem.**, 5: 79-97.

SHUGART, L. R.; MCCARTHY, J. F.; HALBROOK, R. S. (1992). Biological markers of environmental and ecological contamination: an overview. **Risk Anal.**, 12: 353-360.

SMITH, S. P.; PARKINSON, I. H.; LEONG A. S-Y. (1996). Principles of ploidy analysis by static cytometry. **Journal Clin. Pathol.: Mol. Pathol.**, 49: M104-M111.

SUZUKI, D. T.; GRIFFITHS, A. J. F.; MILLER, J. H.; LEWONTIN, R. C. (1992). **Introdução à genética**. 4.^a ed. Guanabara Koogan S. A. Rio de Janeiro, RJ. p. 386

VIDAL, B. C. & MELLO, M. L. S. (1987). **Biologia Celular**. Livraria Atheneu, Rio de Janeiro, RJ. p. 347.

VIDAL, B. C. ; RUSSO, J. & MELLO, M. L. S. (1998). DNA content and chromatin texture of benzo(a)pyrene-transformed human breast epithelial cells as assessed by image analysis. **Exp. Cell Res.**, 244: 77-82.

WILCOX, D.; DOVE, B.; MCDAVID, D.; GREER, D. (1999). **UTHSCSA Image Tool for Windows. Version 2.02**. The University of Texas Health Science Center in San Antonio.